Norme internationale

ISO 20631

Première édition
2024-07

Version corrigée
2026-10

Préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en folates totaux par extraction trienzymatique et chromatographie liquide à ultra performance (CLUHP) couplée à une spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)

Infant formula and adult nutritionals — Determination of total folate content by trienzyme extraction and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)

Sample Document
Full document from standards.iteh.ai

Numéro de référence
ISO 20631:2024(fr)

© ISO 2024

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2024

Tous droits réservés.

La présente publication de l'ISO est protégée par le droit d'auteur et demeure la propriété de l'ISO et/ou de ses concédants de licence.

Le contenu de la présente publication de l'ISO est fourni sous licence, et n'est pas vendu. Son utilisation est soumise aux conditions de licence applicables définies par l'ISO, un organisme membre de l'ISO, ou un distributeur tiers agréé.

Sous réserve des besoins liés à sa mise en œuvre ou d'une autorisation expresse prévue aux termes d'une licence distincte, aucune partie de la présente publication de l'ISO ne peut être reproduite, distribuée, modifiée, utilisée ou mise à disposition sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit – électronique ou mécanique, y compris la photocopie, la numérisation, l'enregistrement ou la publication sur des plateformes numériques internes ou externes.

Toute utilisation hors du champ d'application des droits accordés est interdite et peut donner lieu à des poursuites judiciaires.

ISO copyright office
Case postale 401 • CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **iv**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Principe **1**
5 Réactifs et matériaux **2**
5.1 Liste de réactifs 2
5.2 Préparation du solvant pour solutions étalons 3
5.3 Préparation des solutions étalons de folates 4
5.4 Préparation des solutions mères d'étalons internes de folates 5
5.5 Préparation des solutions d'étalonnage 7
5.6 Préparation de la solution de substrat pour évaluer l'activité conjugase de plasma 8
5.7 Réactif pour l'analyse des folates 8
6 Appareillage **10**
7 Mode opératoire **11**
7.1 Préparation des échantillons 11
7.1.1 Traitement des échantillons pour les rendre homogènes 11
7.1.2 Reconstitution de l'échantillon en poudre en liquide 11
7.2 Extraction 12
7.3 Purification des échantillons 12
7.4 Analyse instrumentale 13
7.4.1 Analyse du blanc d'instrument, des solutions d'étalonnage, du blanc de méthode et des échantillons 13
7.4.2 Conditions de CLUHP et paramètres de SM pour différents systèmes 13
8 Calculs **14**
8.1 Calcul des rapports des aires de pics des vitamères de folates aux aires de pics des étalons internes 14
8.2 Courbe d'étalonnage 14
8.3 Calcul de la concentration des vitamères de folates dans le blanc de méthode 14
8.4 Calcul de la concentration des vitamères de folates dans les échantillons 14
8.5 Calcul de la concentration des vitamères de folates et des folates totaux dans des échantillons reconstitués ou RTF (µg/100 g) 15
8.6 Calcul de la concentration de folates totaux dans les échantillons de poudre (µg/100 g) en l'état 16
8.7 Calcul de la concentration d'acide folique (en nanogrammes) libéré lors du test de la conjugase 16
8.8 Calcul du pourcentage de conversion du Pte-Glu3 en acide folique lors du test de la conjugase 16
9 Fidélité **17**
9.1 Généralités 17
9.2 Répétabilité 17
9.3 Reproductibilité 17
Annexe A (informative) **Données de fidélité** **19**
Bibliographie **20**

Sample Document
Get full document from standards.iteh.ai

© ISO 2024 – Tous droits réservés

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de propriété revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir: www.iso.org/avant-propos.html.

Sample Document
get full document from standards.iteh.ai

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Il est publié par l'ISO, et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans le présent document est l'équivalent de la méthode officielle de l'AOAC 2011.06, Total Folate in Infant Formula and Adult Nutritionals by Trienzyme Extraction and LC-MS/MS Quantitation.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

La présente version corrigée de l'ISO 20631:2024 inclut les corrections suivantes:

— date de publication mise à jour;

— aligné sur la version anglaise.

© ISO 2024 – Tous droits réservés

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024

Préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en folates totaux par extraction trienzymatique et chromatographie liquide à ultra performance (CLUHP) couplée à une spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la teneur en folates totaux dans les préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes par extraction trienzymatique et chromatographie liquide à ultra haute performance (CLUHP) couplée à une spectrométrie de masse en tandem (SM/SM).

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

Sample Document

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

get full document from standards.iteh.ai

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse https://www.iso.org/obp

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse https://www.electropedia.org/

3.1
produit nutritionnel pour adultes
aliment spécialement formulé, complet sur le plan nutritionnel, consommé sous forme liquide, qui peut constituer la seule source d'alimentation, fabriqué à partir d'un mélange de lait, de soja, de riz, de lactosérum, de protéine hydrolysée, d'amidon et d'acides aminés, avec et sans protéine intacte

3.2
préparation pour nourrissons
substitut du lait maternel spécialement fabriqué pour satisfaire à lui seul les besoins nutritionnels des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie, jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée

[SOURCE: Codex Standard 72-1981]

4 Principe

Les folates, présents dans un échantillon sont extraits dans un tampon (pH = 6,0) contenant des étalons internes, par des traitements à la protéase, à l'amylase et à la conjugase de plasma de rat (digestion trienzymatique). L'extrait est purifié et concentré par extraction en phase solide (SPE) avec échangeur d'anions faibles (WAX). Les formes polyglutamates des folates présents dans l'échantillon sont déconjuguées en monoglutamates pendant l'extraction, puis analysées par CLUHP-SM/SM. L'acide folique, le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH_3-THF) et le 5-formyl-tétrahydrofolate (5-CHO-THF) sont quantifiés, et la teneur en

© ISO 2024 – Tous droits réservés

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024

folates totaux est estimée et exprimée sous forme d'acide folique. L'acide folique (^{13}C-acide folique), le 5-CH_3-THF (^{13}C-5-CH_3-THF) et le 5-CHO-THF (^{13}C-5-CHO-THF) marqué aux isotopes sont utilisés comme étalons internes (IS).

5 Réactifs et matériaux

Pendant l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau d'une pureté équivalente.

Sauf spécification contraire, la plupart des produits chimiques utilisés sont de qualité CL-SM. Les références et les fournisseurs des produits, lorsqu'ils sont énumérés, reflètent ceux utilisés lors de la validation. Des produits chimiques équivalents peuvent être utilisés.

Tous les produits chimiques utilisés pendant la préparation des étalons ont été stockés à une température minimale de –20 °C ou conformément aux instructions du fabricant. Étant donné que les vitamères de folates sont photosensibles, tous les échantillons et étalons doivent être préparés, manipulés et stockés à l'abri de la lumière ou sous un éclairage anti-lumière jaune ou sous filtre protégeant des UV. Si les étalons et les échantillons doivent être transportés dans une zone, ou en passant par une zone, sans protection contre les UV, ils doivent être totalement emballés dans une feuille d'aluminium.

Stocker les produits chimiques conformément aux lignes directrices du fabricant ou aux conventions établies.

5.1 Liste de réactifs

5.1.1 Acide folique (étalon) (FA), Schircks Laboratories, réf. 16.203[1)].

Sample Document

5.1.2 Acide (6R,S)-5-méthyl-5,6,7,8-tétrahydrofolique (5-CH_3-THF), sel de calcium, Schircks Laboratories, réf. 16.235[1].

5.1.3 Acide (6S)-5-formyl-5,6,7,8-tétrahydrofolique (5-CHO-THF), sel de calcium, Schircks Laboratories, réf. 16.221[1].

5.1.4 Acide ptéroyltri-γ-L-glutamique (Triglutamate d'acide folique) (Pte-Glu3), Schircks Laboratories, réf. 16.253[1].

Ce réactif peut également provenir de Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada, réf. P840220[1].

5.1.5 Acide folique marqué au $^{13}C_5$ (étalon interne) ($^{13}C_5$-FA), IsoSciences, PA, réf. 14139[1].

5.1.6 Acide (6S)-5-méthyltétrahydrofolique marqué au $^{13}C_5$ ($^{13}C_5$-CH_3-THF), sel de calcium (étalon interne), IsoSciences, PA, réf. 14168Ca[1)].

5.1.7 Acide (6S)-5-formyltétrahydrofolique marqué au $^{13}C_5$ ($^{13}C_5$-CHO-THF), sel de calcium (étalon interne), Merck Cie[1)].

Le réactif peut également provenir de asi chemicals, 1837 University Circle, Sci. Bldg, Rm. 308, Cheyney, PA 19319, États-Unis. Web: www.asichemicals.com; email: info@asichemicals.com, Tél: 609-440-0020[1)]. Disponible en quantité de 1 mg. Un kit contenant les trois étalons internes, chacun en quantité de 1 mg, est également disponible.

5.1.8 α-Amylase d'*Aspergillus oryzae*, poudre, ≥ 150 unités/mg protéine, Sigma-Aldrich, réf. A9857[1)].

1) Les produits chimiques répertoriés ont été utilisés lors de l'étude de validation. Ces produits sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

© ISO 2024 – Tous droits réservés

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024

5.1.9 Protéase de *Bacillus licheniformis*, Subtilisine A, poudre lyophilisée, Sigma-Aldrich, réf. P3910[1)].

5.1.10 Conjugase (plasma de rats Sprague Dawley mâles) avec lithium et héparine (non filtrée), BIOIVT, réf. RAT00PLLHMNN[1)].

Le réactif à base de plasma de rats peut également provenir d'Odin Bioscience[1)], 1621 Central Ave., Cheyenne, WY 82001, info@odinbioscience.com ou de Lampire Biological Laboratories, Pippersville, 18947. PA, États-Unis[1)].

5.1.11 Solution d'hydroxyde d'ammonium, (certifiée ACS Plus) 28 % à 30 % (fraction massique), (ammoniaque), Fisher, réf. A669-500[1)].

5.1.12 Phosphate de sodium, dibasique anhydre (grains ou poudre/certifiée ACS, ≥ 99 %), Fisher, réf. S-374-500[1)].

5.1.13 Méthanol, qualité Optima CL/SM, 99,9 % minimum, Fisher, réf. A456-4[1)].

5.1.14 Acide acétique glacial, (certifié ACS), Fisher, réf. A38S-212[1)].

5.1.15 Hydroxyde de sodium, (granulés/certifié ACS), ≥ 97 %, Fisher, réf. S318-1[1)].

5.1.16 Acétate d'ammonium, (cristallin/certifié ACS), ≥ 97 %, Fisher, réf. A637-500[1)].

5.1.17 2-Mercaptoéthanol, (qualité électrophorèse), ≥ 98 %, Fisher, réf. BP176-100; Sigma M6250[1)].

Sample Document

5.1.18 Acide ascorbique, (poudre cristalline blanche), ≥ 99 %, Fisher, réf. BP351-500[1)].

5.1.19 Tris-(2-carboxyéthyl)phosphine, chlorhydrate (TCEP-HCl), Fisher, réf. AC 363830100[1)].

get full document from standards.iteh.ai

5.1.20 Charbon, (charbon actif Darco G-60), Fisher, réf. D127-500[1)].

5.1.21 Acide formique, (qualité réactif), ≥ 95 %, eau ≤ 2,5 %, acide acétique < 1 %, Sigma F0507[1)].

5.1.22 Eau, (haute pureté, appropriée pour la phase mobile pour CLHP), résistivité jusqu'à 18 MΩ·cm[1)].

5.2 Préparation du solvant pour solutions étalons

5.2.1 Solution stock de solvant, concentration $c = 15{,}6 \times 10^{-3}$ mol/l de tampon acétate d'ammonium avec 25 % d'acide ascorbique et 1 % de mercaptoéthanol, pH = 5,5.

Peser exactement 0,6 g ± 0,01 g d'acétate d'ammonium et transférer dans un bécher de 500 ml. Sous une hotte aspirante, ajouter lentement environ 300 ml d'eau pour CLHP et 2,4 ml d'acide acétique glacial. Ajouter 125 g d'acide ascorbique et 5 ml de 2-mercaptoéthanol. Agiter pour dissoudre complètement. Ajuster le pH à 5,5 à l'aide d'hydroxyde d'ammonium concentré (28 % à 30 %). Transférer la solution dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter au volume (500 ml) avec de l'eau pour CLHP. Mélanger soigneusement.

5.2.2 Solution de solvant intermédiaire, $c = 1{,}6 \times 10^{-3}$ mol/l de tampon acétate d'ammonium avec 1 % d'acide ascorbique, pH = 5,5.

Peser exactement 0,12 g ± 0,001 g d'acétate d'ammonium et transférer dans un bécher de 1 l. Sous une hotte aspirante, ajouter lentement environ 700 ml d'eau pour CLHP et 480 µl d'acide acétique glacial. Ajouter 10 g d'acide ascorbique et agiter jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 5,5, si nécessaire, à l'aide d'hydroxyde d'ammonium concentré. Transférer la solution dans une fiole jaugée de 1 l et compléter au volume avec de l'eau pour CLHP. Mélanger soigneusement.

© ISO 2024 – Tous droits réservés

ISO 20631:2024 • https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024